

PCT/KR 03 / 02859

RO/KR 03. 01. 2004



별첨 사본은 아래 출원의 원본과 동일함을 증명함.

This is to certify that the following application annexed hereto
is a true copy from the records of the Korean Intellectual
Property Office.

출 원 번 호 : 10-2002-0085716
Application Number

출 원 년 월 일 : 2002년 12월 28일
Date of Application DEC 28, 2002

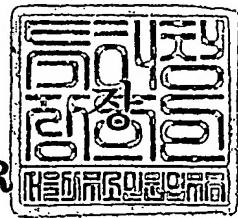
출 원 인 : 주식회사 태평양
Applicant(s) AMOREPACIFIC CORPORATION

**PRIORITY
DOCUMENT**
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

2003 년 12 월 30 일



특 허 청
COMMISSIONER



【서지사항】

【서류명】	특허출원서
【권리구분】	특허
【수신처】	특허청장
【제출일자】	2002.12.28
【발명의 명칭】	진세노사이드 F1을 유효성분으로 하는 Bcl-2 발현 조절제
【발명의 영문명칭】	control agent of Bcl-2 expression being Ginsenoside F1 as active component
【출원인】	
【명칭】	주식회사 태평양
【출원인코드】	1-1998-003983-5
【대리인】	
【성명】	윤동열
【대리인코드】	9-1998-000307-3
【포괄위임등록번호】	2001-033730-9
【대리인】	
【성명】	이선희
【대리인코드】	9-1998-000434-4
【포괄위임등록번호】	2001-033731-6
【발명자】	
【성명의 국문표기】	조시영
【성명의 영문표기】	CHO, Si Young
【주민등록번호】	710220-2481913
【우편번호】	449-905
【주소】	경기도 용인시 기흥읍 상갈리 487-8 204호
【국적】	KR
【발명자】	
【성명의 국문표기】	이은희
【성명의 영문표기】	LEE, Eun Hee
【주민등록번호】	760324-2056615
【우편번호】	449-905
【주소】	경기도 용인시 기흥읍 상갈리 476-8 B02호
【국적】	KR

【발명자】**【성명의 국문표기】**

김수정

【성명의 영문표기】

KIM,Su Jung

【주민등록번호】

730107-2780714

【우편번호】

449-904

【주소】

경기도 용인시 기흥읍 보라리 314-1 비전하우스 303호

【국적】

KR

【발명자】**【성명의 국문표기】**

신의석

【성명의 영문표기】

SHIN,Eui Seok

【주민등록번호】

730530-1024521

【우편번호】

449-915

【주소】경기도 용인시 구성면 언남리 493 하마비마을 동부센트레빌 105
동 30 3호**【국적】**

KR

【발명자】**【성명의 국문표기】**

장희경

【성명의 영문표기】

CHANG,Hui Kyoung

【주민등록번호】

751130-2784023

【우편번호】

449-904

【주소】

경기도 용인시 기흥읍 보라리 314-1 비전하우스 301호

【국적】

KR

【발명자】**【성명의 국문표기】**

김덕희

【성명의 영문표기】

KIM,Duck Hee

【주민등록번호】

601013-2051117

【우편번호】

137-043

【주소】

서울특별시 서초구 반포3동 한양아파트 2동 902호

【국적】

KR

【발명자】**【성명의 국문표기】**

영명훈

【성명의 영문표기】

YEOM,Myeong Hoon

【주민등록번호】

671025-1251217

【우편번호】	449-845		
【주소】	경기도 용인시 수지읍 죽전2동 832번지 벽산아파트 101동 902호		
【국적】	KR		
【발명자】			
【성명의 국문표기】	우광식		
【성명의 영문표기】	WOO, Kwang Sik		
【주민등록번호】	740115-1394631		
【우편번호】	380-892		
【주소】	충청북도 충주시 신니면 송암리 169번지		
【국적】	KR		
【발명자】			
【성명의 국문표기】	이태룡		
【성명의 영문표기】	LEE, Tae Ryong		
【주민등록번호】	650214-1114216		
【우편번호】	442-470		
【주소】	경기도 수원시 팔달구 영통동 태영아파트 932동 1303호		
【국적】	KR		
【발명자】			
【성명의 국문표기】	심영철		
【성명의 영문표기】	SIM, Young Chul		
【주민등록번호】	540816-1030515		
【우편번호】	463-020		
【주소】	경기도 성남시 분당구 수내동 파크타운 삼익아파트 123동 1402호		
【국적】	KR		
【취지】	특허법 윤동열 이선희	제42조의 (인) (인)	규정에 의하여 위와 같이 출원합니다. 대리인 대리인
【수수료】			
【기본출원료】	20	면	29,000 원
【가산출원료】	2	면	2,000 원
【우선권주장료】	0	건	0 원
【심사청구료】	0	항	0 원
【합계】	31,000 원		



1020020085716

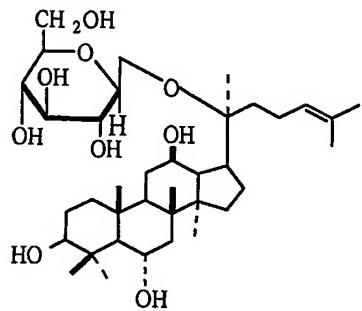
출력 일자: 2004/1/3

【첨부서류】

1. 요약서·명세서(도면)_1통 2. 위임장[2001년 6월 11일자 포괄위
임등록]_1통

【요약서】**【요약】**

본 발명은 하기 화학식 1로 표현되는 진세노사이드 F1(20-O- β -D-글루코파라노실-20(S)-프로토파나사트리올)을 유효성분으로 하는 Bcl-2 발현 조절제에 관한 것이다.

[화학식 1]**【대표도】**

도 5

【색인어】

진세노사이드 F1, Bcl-2 발현 조절제, 세포사멸 억제제, Brn-3a 발현 억제제, 세포사멸 촉진제

【명세서】**【발명의 명칭】**

진세노사이드 F1을 유효성분으로 하는 Bcl-2 발현 조절제{control agent of Bcl-2 expression being Ginsenoside F1 as active component}

【도면의 간단한 설명】

도 1은 진세노사이드 F1을 HaCaT 피부세포에 처리하고 자외선을 조사하였을 때, 처리하지 않은 대조구에 비해 얼마나 세포사멸을 막았는지를 MTT 환원반응 실험을 수행하여 조사한 결과를 나타낸 그래프이다.

도 2는 진세노사이드 F1을 처리하고 자외선을 조사한 경우와 처리하지 않은 대조구에 자외선을 조사한 경우의 세포모양 변화를 보여준다.

도 3은 진세노사이드 F1을 처리한 세포와 처리하지 않은 대조구에 자외선을 조사한 경우에 나타나는 DNA의 단편화 정도를 보여준다.

도 4는 진세노사이드 F1을 처리한 세포와 처리하지 않은 대조구에 자외선을 조사한 경우에 PARP의 절단정도를 Western blot을 수행하여 나타낸 결과이다.

도 5는 진세노사이드 F1을 처리한 세포와 처리하지 않은 대조구에 자외선을 조사하여, 세포사멸률 조절하는 Bcl-2의 발현 정도를 mRNA 수준에서 조사한 것이다.

도 6은 진세노사이드 F1을 처리한 세포와 처리하지 않은 대조구에 자외선을 조사하여, Bcl-2의 전사조절 인자인 Brn-3a의 발현변화를 Western blot을 수행하여 나타낸 결과이다. Hsp 70은 동일한 단백질 양이 사용되었음을 나타낸다.

【발명의 상세한 설명】

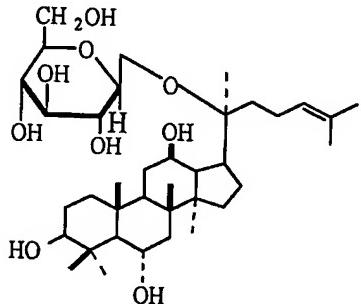
【발명의 목적】

【발명이 속하는 기술분야 및 그 분야의 종래기술】

<7> 본 발명은 하기 화학식 1로 표현되는 진세노사이드 F1(20-O- β -D-글루코파라노실-20(S)-프로토파나사트리올)을 유효성분으로 하는 Bcl-2 발현 조절제에 관한 것이다.

<8> [화학식 1]

<9>



<10> 자외선(Ultraviolet radiation)은 200-400nm의 파장을 가지고 있는 전자기장 스펙트럼의 일부를 구성하고 있는데, 이 중 특히 280-320nm의 파장을 갖는 UVB(Ultraviolet-B)는 피부노화의 가장 중요한 요인으로서 피부화상이나 피부암을 유발한다. 피부가 자외선에 노출되면 DNA, 단백질, 지질 같은 세포성분이 손상되어 일광화상(Sunburn) 세포가 생성된다. 일광화상 세포는 DNA 단편화 현상과 카스파아제(Caspase) 효소의 활성화 등을 동반하는 세포사멸을 겪게 된다. 고설량의 자외선에 노출된 세포는 복구할 수 없는 심각한 DNA 손상을 입게 되는데, 이 경우 세포사멸 현상은 이러한 세포들의 죽음을 유도하여 이들이 종양으로 발전하는 것을 막는다. 따라서, 세포손상 정도에 따라 특이적으로 세포사멸을 유도하거나 막는 것이 암 발생을 억제하면서 세포의 항상성을 유지하는데 매우 중요하다.

<11> Bcl-2는 이러한 피부세포사멸 과정에서 중요한 역할을 수행한다. Bcl-2 유전자는 핵막과 미토콘드리아 외막에 존재하는 26kDa의 단백질을 암호화한다. Bcl-2는 세포사멸을 억제하는 단백질로서 세포사멸을 촉진하는 Bax와 같은 단백질에 붙어서 이들의 기능을 방해한다. 따라서, Bcl-2와 Bax 단백질 사이의 농도비에 따라 세포가 사멸될 것인지 아닌지가 결정된다.

<12> 현재까지 Bcl-2는 피부세포에서 자외선 조사에 의해 그 발현이 급격히 감소된다고 보고되었으며, Bcl-2를 과발현시킨 세포는 자외선 조사에 의한 세포사멸이 저해된다는 것이 보고되었다. 하지만, Bcl-2의 과발현은 오히려 심각한 DNA 손상을 가진 세포의 사멸까지 저해하여 암을 유발할 수 있다. 그러므로 Bcl-2의 발현을 특이적으로 조절하는 것이 매우 중요하다. 지금 까지 Bcl-2의 기능에 비해 그의 발현조절에 관해서는 거의 알려져 있지 않으나, 신경세포에서 는 몇 개의 전사조절인자가 밝혀졌고, pRb, c-myb, Brn-3a 등이 이미 알려져 있다. 특히 Brn-3a는 type IV POU domain 전사조절인자로서 Bcl-2의 P2 프로모터(promoter)에 붙어서 Bcl-2 유전자의 발현을 조절하여, 세포사멸로부터 신경세포를 보호한다.

<13> 그러나, 아직까지 인간 피부에서 유래한 HaCaT 세포에서 Bcl-2의 발현을 조절하는 기작이나 조절인자에 관해서는 거의 알려지지 않았다.

【발명이 이루고자 하는 기술적 과제】

<14> 이에 본 발명자들은 인삼 정제 사포닌에서 분리한 진세노사이드 F1을 유효한 농도로 인간 피부세포주인 HaCaT 세포에 처리했을 때, 자외선 조사에 의해 감소되었던 Bcl-2 유전자의 발현이 정상적인 농도로 유지된다는 사실과 이를 통해 세포사멸이 억제된다는 사실을 확인하였

다. 즉, 진세노사이드 F1이 Bcl-2의 발현을 조절하여 세포사멸을 억제한다는 사실을 기초로 하여 본 발명을 완성하게 되었다.

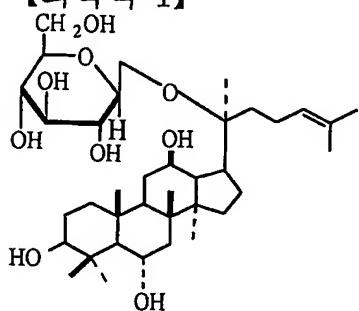
<15> 따라서, 본 발명의 목적은 진세노사이드 F1을 유효성분으로 하는 Bcl-2 발현 조절제를 제공하는 것이다.

<16> 또한 본 발명의 목적은 진세노사이드 F1을 유효성분으로 하는 세포사멸 촉진제 또는 억제제를 제공하는 것이다.

【발명의 구성 및 작용】

<17> 본 발명에서는 하기 화학식 1로 표현되는 진세노사이드 F1을 유효성분으로 하는 Bcl-2 발현 조절제를 제공한다.

【화학식 1】



<19> 진세노사이드 F1은 자외선에 의해 Brn-3a의 발현이 감소되는 것을 억제하고, 이로 인해 Bcl-2의 발현이 감소되는 것을 억제함으로써 저설량의 자외선에 의해 피부세포가 사멸되는 것을 방지한다. 즉, 진세노사이드 F1 자체는 Bcl-2의 발현을 증가시키지 않지만, 자외선 조사에 의해 Bcl-2의 발현이 감소되는 것을 억제한다.

<20> 따라서, 진세노사이드 F1은 저설량의 자외선이 조사되었을 때는 Bcl-2의 발현이 감소되는 것을 억제하여 피부세포가 사멸되는 것을 방지하고, 고설량의 자외선이 조사되었을 때에는

오히려 세포사멸을 유도함으로써 피부암을 유발시킬 수 있는 위험성 없이, 세포손상을 방지하는 피부노화 억제물질로서 사용할 수 있다.

- <21> 본 발명에서는 진세노사이드 F1이 Bcl-2의 전사조절인자인 Brn-3a의 발현을 조절함으로써 Bcl-2의 발현 농도를 정상세포 수준으로 유지해 준다는 사실을 확인하였다.
- <22> 따라서, 진세노사이드 F1은 세포내에 항상 일정량의 Bcl-2의 농도가 유지될 수 있도록 하여 세포가 사멸되는 것을 방지하였다. 하지만, 진세노사이드 F1 자체는 Bcl-2 유전자의 발현을 증가시키지는 않았다. 이러한 결과는 진세노사이드 F1이 암 발생의 부작용 없이 자외선에 의한 세포사멸을 억제, 세포손상을 방지하는 효능을 가진다는 것을 보여준다.
- <23> 이하, 실시예에 의해 본 발명을 보다 상세히 설명한다. 그러나, 이를 실시예는 본 발명의 예시적인 기재일 뿐이며, 본 발명이 이를 실시예에만 한정되는 것은 아니다.

<24> [참조예 1] 인삼 정제 사포닌의 제조

<25> 홍삼, 백삼, 수삼, 미삼 또는 이들의 인삼엽 2kg에 물, 물을 포함한 메탄을 또는 메탄을 4ℓ를 넣고, 3회 환류 추출한 후, 15℃에서 6일간 침적시켰다. 그 후, 여과포 여과와 원심분리를 통해 잔사와 여액을 분리하고, 분리된 여액을 감압농축하여 얻은 엑기스를 물에 혼탁한 후에, 에테르 1ℓ로 5회 추출하여 색소를 제거하고, 수충을 1-부탄을 500ml로 3회 추출하였다. 이로부터 얻은 총 1-부탄을 5% KOH로 처리한 다음 중류수로 세척한 뒤, 감압농축하여 1-부탄을 엑기스를 얻고, 이를 소량의 메탄올에 녹인 다음, 대량의 에틸아세테이트에 추가하여, 생성된 침전물을 건조함으로써, 인삼 정제 사포닌 추출물 40~80g을 얻었다.

<26> [참조예 2] 진세노사이드 F1의 제조

<27> 제조 예 1의 인삼 정제 사포닌 10g을 시트레이트 완충용액(pH 4.0) 1000㎖에 용해시키고, 여기에 페니실리움속에서 분리한 나린지나제 또는 아스퍼질러스속에서 분리한 펙티나제 효소 15g을 첨가하여 40℃에서 교반시키면서 48시간 반응시켰다. 반응이 종료되면 10분간 가열하여 효소를 불활성화시키고, 반응액은 동량의 에틸아세테이트로 3회 추출하여 농축하였다. 얻은 생성물을 실리카겔 컬럼 크로마토그래피(크로로포름:메탄올=9:1)로 분리하여 진세노사이드 F1 1.5g을 얻었다.

<28> [실시예 1] 진세노사이드 F1 처리에 의해 자외선조사시 유도된 HaCaT 세포의 사멸 억제

<29> [1 단계] 세포주와 세포 배양

<30> 인체 피부 세포주(human keratinocyte)인 HaCaT를 10% 우혈청(fetal bovin serum)을 포함한 DMEM 배지(Dulbecco's modified Eagle's Medium, Gibco 1210-0038)에서 배양하였고, 배양은 모두 37℃, 5% CO₂ 배양기에서 수행하였다.

<31> [2 단계] 진세노사이드 F1 처리에 의해 자외선조사시 유발된 세포사멸의 억제 효과

<32> 단계 1에서 배양된 세포주를 트립신 처리하여 단일세포 혼탁액을 만들고 6-well에 2 x 10⁵ 개씩 분주하여, 24시간 배양하였다. 그 후 우혈청이 포함되지 않은 DMEM 배지로 교환하여 다시 24시간 동안 배양한 후, 1-10 μM 농도의 진세노사이드 F1을 처리하였다. 진세노사이드 F1은 100% 에탄올에 녹여서 항상 배지의 1/1000 의 농도가 포함되도록 하였다. 24시간 동안 진세노사이드 F1을 처리한 후, 인산완충용액(PBS)으로 세척하고, 인산완충용액을 넣은 상태에서 60

- 120mJ/cm² 농도의 UVB를 조사하였다. 인산완충용액을 버리고, 다시 같은 농도의 진세노사이드 F1이 포함된 배지로 교환하였다. 진세노사이드 F1을 처리하지 않은 세포를 대조구로 동일하게 배양하였다. 자외선 조사 24시간 후, 진세노사이드 F1을 처리한 세포와 처리하지 않은 세포에 3-[4,5-다이메틸 사입졸]-2,5-다이페닐테트라졸리움 브로마이드(MTT, Sigma) 용액을 넣고 37°C에서 4시간동안 배양하였다. 이후 다이메틸셀룰사이드를 넣고 녹인 후 ELISA reader(Thermo Max, Molecular Devices Co.)를 이용하여 540nm의 파장에서 형성된 포르마잔 다이의 광학적 농도(OD)을 측정하였다. 자외선을 조사하지 않은 세포의 OD 값을 100%로 계산하여 상대적인 값을 세포의 생존수로 도 1에 나타내었다. 진세노사이드 F1을 처리한 세포에서는 처리하지 않은 세포에 비교하여 자외선에 노출되었을 때 약 1.5배정도 세포사멸이 억제되었다. 하지만, 120 mJ/cm² 농도의 자외선 조사시에는 오히려 진세노사이드 F1을 처리한 세포가 처리하지 않은 세포에 비해 많은 수가 죽었다.

- 33> [실시예 2] 진세노사이드 F1 처리에 의해 자외선 조사시 유발되는 HaCaT 세포의 DNA 단편화 억제
- 34> [1 단계] 세포주와 세포 배양
- 35> 실시예 1의 1단계와 동일한 방법으로 배양하였다
- 36> [2 단계] 진세노사이드 F1 처리에 의해 자외선 조사시 유발되는 HaCaT 세포의 DNA 단편화 억제
 - 37> 단계 1에서 배양된 세포주를 트립신 처리하여 단일세포 혼탁액을 만들고 6-well에 2 x 10⁵ 개씩 분주하여, 24시간 배양하였다. 그 후 우혈청이 포함되지 않은 DMEM 배지로 교환하여

다시 24시간동안 배양한 후, $5\mu M$ 농도의 진세노사이드 F1을 처리하였다. 24시간 동안 진세노사이드 F1을 처리한 후, 인산완충용액(PBS)으로 세척하고, 인산완충용액을 넣은 상태에서 $60mJ/cm^2$ 농도의 UVB를 조사하였다. 인산완충용액을 버리고, 다시 같은 농도의 진세노사이드 F1이 포함된 배지로 교환하였다. 진세노사이드 F1을 처리하지 않은 세포를 대조구로 동일하게 배양하였다. 자외선 조사 24시간 후, 진세노사이드 F1을 처리한 세포와 처리하지 않은 세포를 인산완충용액(PBS)으로 세척하고, 4% 파라포름알데하이드가 포함된 인산완충용액으로 15분간 처리하여 세포를 고정하였다. 인산완충용액(PBS)으로 세척하고, 0.05% tween 20과 0.2% BSA가 포함된 인산완충용액(PBS)에서 15분 동안 반응시켰다. 터미널 데옥시 뉴클레오파이드 트랜스퍼레이즈(Terminal deoxynucleotidyl transferase) 반응용액(TUNEL Apoptosis detection kit, Upstate, USA)을 넣고 1시간 동안 반응하였다. 반응 중단 버퍼(TUNEL Apoptosis detection kit, Upstate, USA)를 첨가하여 반응을 멈추고, blocking 용액(TUNEL Apoptosis detection kit, Upstate, USA)을 넣고 20분간 반응시켰다. 아비딘-FITC(TUNEL Apoptosis detection kit, Upstate, USA)를 첨가한 후 30분간 반응시키고, 인산완충용액으로 세척하였다. 500nM 프로파디움 아이오다이드 용액을 이용하여 counterstain한 후 형광현미경으로 관찰하였다. 약 200개의 세포를 관찰하여 전체 세포 중 DNA 단편화가 일어난 세포를 계산하였다. 진세노사이드 F1을 처리한 세포가 처리하지 않은 세포보다 자외선조사에 의해 일어나는 DNA 단편화 현상이 2.4배정도 감소하였다. 그 결과를 도 3에 나타내었다.

38> [실시예 3] 진세노사이드 F1 처리에 의해 자외선 조사시 일어나는 PARP 단백질의 절단 억제 효과

39> [1 단계] 세포주와 세포 배양

<40> 실시 예 1의 1단계와 동일한 방법으로 배양하였다.

<41> [2 단계] 진세노사이드 F1 처리에 의해 자외선 조사시 일어나는 PARP 단백질의 절단 억제

<42> 단계 1에서 배양된 세포주를 트립신 처리하여 단일세포 혼탁액을 만들고 6-well에 2 x 10⁵ 개씩 분주하여, 24시간 배양하였다. 그 후 우혈청이 포함되지 않은 DMEM 배지로 교환하여 다시 24시간 동안 배양한 후, 5 μM 농도의 진세노사이드 F1을 처리하였다. 24시간 동안 진세노사이드 F1을 처리한 후, 인산완충용액(PBS)으로 세척하고, 인산완충용액을 넣은 상태에서 60mJ/cm²의 UVB를 조사하였다. 인산완충용액을 버리고, 다시 5 μM 농도의 진세노사이드 F1이 포함된 배지로 교환하였다. 진세노사이드 F1을 처리하지 않은 세포를 대조구로 동일하게 배양하였다. 자외선 조사 24시간 후, 진세노사이드 F1을 처리한 세포와 처리하지 않은 세포를 인산완충용액(PBS)로 세척하고, 트립신을 처리하여 세포를 수거하고, 이를 8M 우레아, 2% CHAPS, 50mM DTT, 2M thiourea, 2mM PMSF, 100μg/ml leupeptine의 단백질 추출 완충용액 500μl을 처리한 후 10분간 상온에서 방치하였다. 그 후 4°C에서 10분간 15,000g의 중력가속도로 원심분리하고, 상층액을 수거한 후 BIO-Rad Protein Dye Reagent™을 이용하여 단백질을 정량하였다. 20μg의 단백질을 8% SDS-PAGE를 이용하여 크기별로 분리하고, 50V로 12시간동안 PDF(BioRad) 막에 blotting하였다. 이 blot을 5% 무지방 우유 용액으로 1시간동안 blocking 한 후 일차 항체로는 polyclonal anti-PARP(Santa Cruz)를, 이차 항체로는 horse radish peroxidase가 결합된 anti-rabbit IgG(amersham)를 이용하였고, Amersham사의 enhanced chemiluminescence(ECL) 키트를 이용하였다. 반응시킨 blot은 X선 Fuji 필름에 감광시킨 후 현상하여 단백질 발현 정도를 확인하였다. 필름 상의 밴드는 PowerLook 2100 XL(umax)를 이용하여 스캐닝한 후 ImageMaster 2D Elite(Amersham Bioscience) 이미지 분석프로그램을 이용하여 분석하였다.

PARP 단백질의 절단된 양은 대조구의 절단된 양을 기준으로 하여 상대적인 값으로 나타내었다. 진세노사이드 F1을 처리한 세포의 경우가 처리하지 않은 세포보다 자외선조사에 의해 일어나는 PARP 단백질의 절단화 현상이 1.4배정도 감소하였다. 그 결과를 도 4에 나타내었다.

<43> [실시예 4] 진세노사이드 F1 처리에 의해 자외선 조사시 일어나는 Bcl-2 유전자의 발현 감소의 억제

<44> [1 단계] 세포주와 세포 배양

<45> 실시예 1의 1단계와 동일한 방법으로 배양하였다.

<46> [2 단계] 진세노사이드 F1 처리에 의해 자외선 조사시 일어나는 Bcl-2 유전자의 발현 감소 현상의 억제

<47> 단계 1에서 배양된 세포주를 트립신 처리하여 단일세포 혼탁액을 만들고 6-well에 2 x 10⁵ 개씩 분주하여, 24시간 배양하였다. 그 후 우혈청이 포함되지 않은 DMEM 배지로 교환하여 다시 24시간동안 배양한 후, 5 μM 농도의 진세노사이드 F1을 처리하였다. 24시간동안 진세노사이드 F1을 처리한 후, 인산완충용액(PBS)으로 세

척하고, 인산완충용액을 넣은 상태에서 60mJ/cm²의 UVB를 조사하였다. 인산완충용액을 버리고, 다시 5 μM 농도의 진세노사이드 F1이 포함된 배지로 교환하였다. 진세노사이드 F1을 처리하지 않은 세포를 대조구로 동일하게 배양하였다. 자외선 조사 24시간 후, 또는 자외선조사하지 않고 시간별로, 진세노사이드 F1을 처리한 세포와 처리하지 않은 세포를 인산완충용액(PBS)으로 세척하고, Oligotex Direct mRNA kits(QIAGEN, Hilden, Germany)를 이용하여 mRNA를 추출하여 정량적인 역전사 PCR을 수행하였다. 정량적인 역전사 PCR을 수행하기 위한 Bcl-2와 glyceraldehydes-3-phosphate dehydrogenase(GAPDH) 유전자의 각 쌍의 프라이머 서열은 표 1과 같다.

<48> 【표 1】

정량적인 역전사 PCR 반응을 위한 Bcl-2와 GAPDH의 프라이머

프라이머	서열
Bcl-2 forward primer	5'-TACGATAACCGGGAGATAGTGA-3' (인간 Bcl-2 cDNA상의 56-77 염기서열)
Bcl-2 reverse Primer	5'-CAGGTGCCGGTTCAGGTACT-3' (인간 Bcl-2 cDNA상의 566-586 염기서열)
GAPDH forward primer	5'-CAACTACATGGTTACATGTTCC-3' (인간 GAPDH cDNA 상의 174-194 염기서열)
GAPDH reverse primer	5'-GGACTGTGGTCATGAGTCCT-3' (인간 GAPDH cDNA 상의 570-589 염기서열)

<49> mRNA 1μg을 50mM Tris-HCl(pH 8.3), 75mM KC1, 3mM MgCl₂, 0.1M DTT, 10mM dNTP, 40units/ml RNase inhibitor의 역전사 반응 완충액 25μl에 넣고, 0.5μg/ml oligo(dT)₁₆의 프라이머와 200units SuperScript II(GibcoBRL)의 역전사 중합효소를 첨가하여 42°C에서 1시간동안 반응시켰다. 이후 역전사 반응 용액 2.5μl를 50mM

KCl, 10mM tris-HCl(pH 8.3), 5mM MgCl₂, 100 μM dNTP의 PCR 반응 완충액 50μl에 섞고, 10 μM 의 프라이머와 0.5U의 Taq DNA 중합효소를 첨가하여 95°C에서 30초, 58°C에서 30초, 72°C에서 30초의 30 사이클을 수행하였다. PCR 결과를 아가로스 젤에 전기영동하고 이를 스캐닝한 후 ImageMaster 2D Elite(Amersham Bioscience) 이미지 분석프로그램을 이용하여 분석하였다. Bcl-2 유전자의 발현정도는 GAPDH 발현양에 대한 상대적인 값으로 나타내었다. 진세노사이드 F1 만을 처리했을 경우, 시간에 따른 Bcl-2 유전자의 발현은 처리하지 않은 세포의 그것과 차이가 없었다. 자외선을 조사했을 때, 진세노사이드 F1을 처리하지 않은 세포의 경우, Bcl-2 유전자의 발현이 감소되어 자외선 조사 24시간 후에는 거의 발현되지 않았다. 그러나, 진세노사이드 F1을 처리한 세포의 경우 자외선을 조사했을 때도 조사하지 않은 경우와 비교하여 거의 차이가 없을 정도로 발현이 유지되었다. 즉, 진세노사이드 F1을 처리하면, 처리하지 않은 경우에 비교하여 Bcl-2 유전자의 발현이 3배정도 증가되었다. 그 결과를 도 5에 나타내었다.

- <50> [실시예 5] 진세노사이드 F1 처리에 의해 자외선 조사시 일어나는 Brn-3a의 발현 감소 억제 효과
- <51> [1 단계] 세포주와 세포 배양
- <52> 실시예 1의 1단계와 동일한 방법으로 배양하였다.
- <53> [2 단계] 진세노사이드 F1 처리에 의해 자외선 조사시 일어나는 Brn-3a의 발현 감소 억제 효과
- <54> 단계 1에서 배양된 세포주를 트립신 처리하여 단일세포 혼탁액을 만들고 6-well에 2 x 10⁵ 개씩 분주하여, 24시간동안 배양하였다. 그 후 우혈청이 포함되지 않은 DMEM 배지로 교환

하여 다시 24시간동안 배양한 후, $5\mu M$ 농도의 진세노사이드 F1을 처리하였다. 24시간동안 진세노사이드 F1을 처리한 후, 인산완충용액(PBS)으로 세척하고, 인산완충용액을 넣은 상태에서 $60mJ/cm^2$ 의 UVB를 조사하였다. 인산완충용액을 버리고, 다시 $5\mu M$ 농도의 진세노사이드 F1이 포함된 배지로 교환하였다. 진세노사이드 F1을 처리하지 않은 세포를 대조구로 동일하게 배양하였다. 자외선 조사 24시간 후, 진세노사이드 F1을 처리한 세포와 처리하지 않은 세포를 인산완충용액(PBS)으로 세척하고, 트립신을 처리하여 세포를 수거하고, 이를 $8M$ 우레아, 2% CHAPS, $50mM$ DTT, $2M$ thiourea, $2mM$ PMSF, $100\mu g/\mu l$ leupeptine의 단백질 추출 완충용액 $500\mu l$ 을 처리한 후 10분간 상온에서 방치하였다. 그 후 $4^\circ C$ 에서 10분간 $15,000g$ 의 중력가속도로 원심분리하고, 상층액을 수거한 후 BI0-Rad Protein Dye Reagent TM을 이용하여 단백질을 정량하였다. $20\mu g$ 의 단백질을 8% SDS-PAGE를 이용하여 크기별로 분리하고, $50V$ 로 12시간동안 PDF(BioRad) 박에 blotting하였다. 이 blot을 5% 무지방 우유 용액으로 1시간동안 blocking 한 후 일차 항체로는 polyclonal anti-Brn-3a(Santa Cruz)를, 이차 항체로는 horse radish peroxidase가 결합된 anti-rabbit IgG(amersham)를 이용하였고, Amersham사의 enhanced chemiluminescence(ECL) 키트를 이용하였다. 반응시킨 blot은 X선 Fuji 필름에 감광시킨 후 현상하여 단백질 발현 정도를 확인하였다. 필름 상의 밴드는 PowerLook 2100 XL(umax)를 이용하여 스캐닝한 후 ImageMaster 2D Elite(Amersham Bioscience) 이미지 분석프로그램을 이용하여 분석하였다. Brn-3a 단백질은 자외선 조사에 의해 그 발현이 감소되었다가, 진세노사이드 F1을 처리하면 다시 발현이 회복되었다. 그 결과를 도 6에 나타내었다.

【발명의 효과】

<55> 이상에서 설명한 바와 같이, 본 발명에서는 진세노사이드 F1이 자외선 조사시 발생하는 Bcl-2의 발현감소를 억제함으로써, 자외선에 의한 세포사멸을 방지할 수 있었고, 고설량의 자외선 조사시에는 오히려 세포사멸을 촉진함으로써 암을 발생시킬 수 있는 위험성을 제거하는 것을 알 수 있었다.

【특허청구범위】

【청구항 1】

진세노사이드 F1을 유효 성분으로 하는 Bcl-2 발현 조절제.

【청구항 2】

진세노사이드 F1을 유효 성분으로 하는 Brn-3a 발현 조절제.

【청구항 3】

저설량의 자외선 조사로 유도되는 세포사멸을 억제하는 것을 특징으로 하는 진세노사이드 F1을 유효 성분으로 하는 세포사멸 억제제.

【청구항 4】

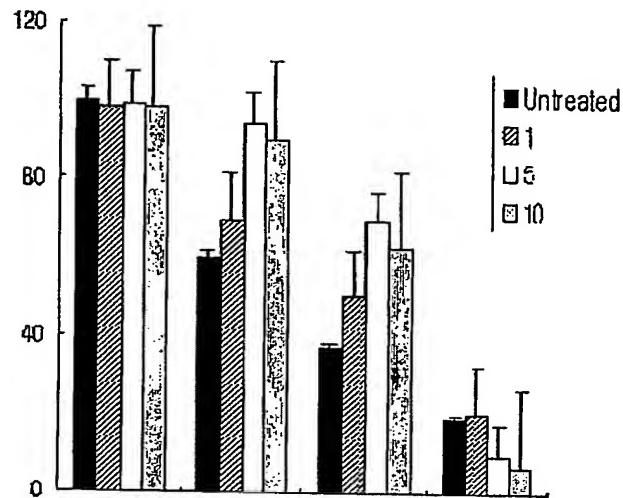
제 3항에 있어서, 상기 세포사멸 억제는 진세노사이드 F1이 자외선에 의한 Bcl-2 발현 감소를 억제하는 것에 의한 것임을 특징으로 하는 세포사멸 억제제.

【청구항 5】

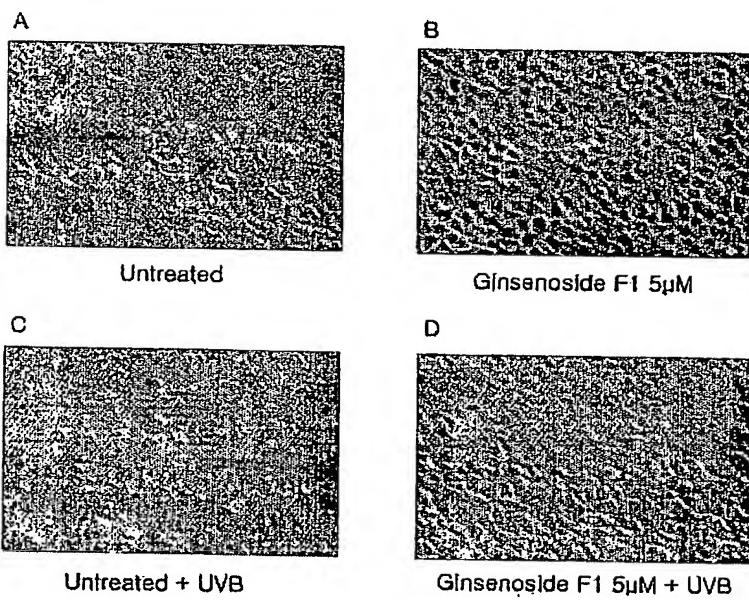
고설량의 자외선 조사로 유도되는 세포사멸을 촉진하는 진세노사이드 F1을 유효 성분으로 하는 세포사멸 촉진제.

【도면】

【도 1】



【도 2】

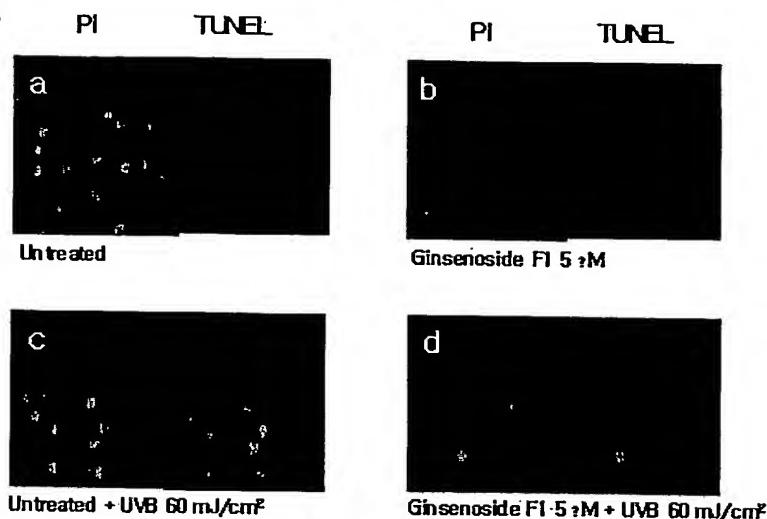


1020020085716

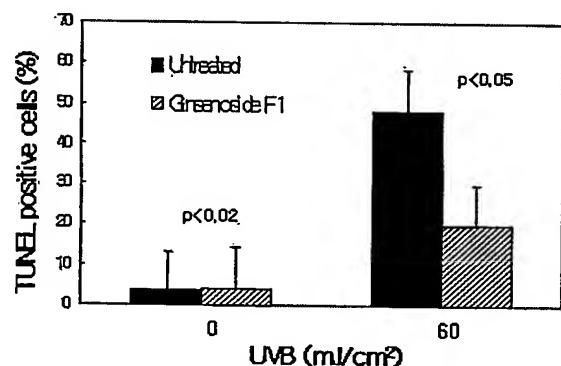
출력 일자: 2004/1/3

【도 3】

A



B

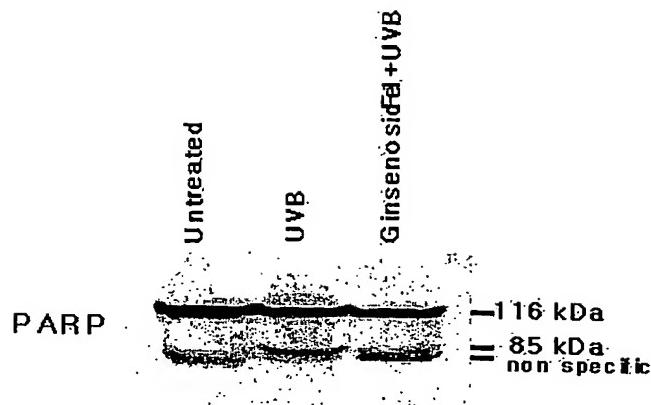


1020020085716

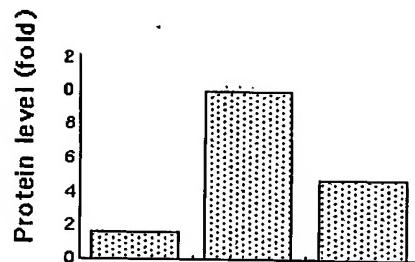
출력 일자: 2004/1/3

【도 4】

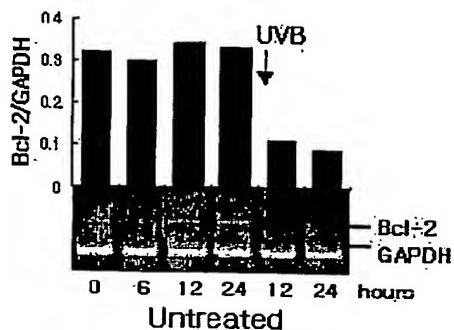
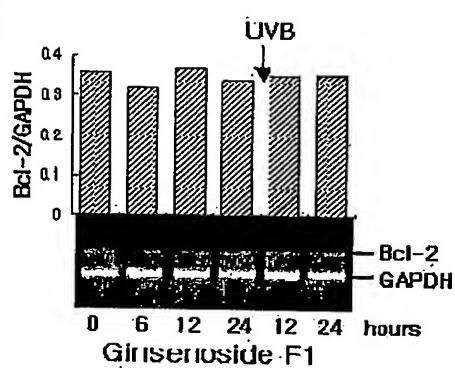
A



B



【도 5】

A**B**

【도 6】

